
原著論文

マウス胃幽門前庭部における
カハールの介在細胞 (ICC) の分布と微細構造上の特徴

古 谷 朋 子^a

Distribution and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal
in the mouse gastric antrum

Tomoko Furutani^a

(^a Graduate School of Human Science, Waseda University)

(Received : May 6, 2009 ; Accepted : July 17, 2009)

Abstract

The present study aimed to clarify the distribution and cytological features of interstitial cells of Cajal (ICC) of the myenteric region (ICC-MP), which are known to have a pacemaker function for gastric movement, in the mouse gastric antrum. Around the myenteric ganglia in the antrum, ICC-MP were observed as clusters or bundles of Kit-immunoreactive cells; however, such aggregations of ICC-MP were not observed in the corpus or fundus. On electron microscopy, ICC-MP were characterized by abundant mitochondria, bundles of intermediate filaments and caveolae on the cell membrane. ICC-MP frequently connected with one another via gap junctions and showed close contact with nerve terminals containing many synaptic vesicles. They also showed close associations with macrophages that were densely distributed in the myenteric region. These histological characteristics are discussed in terms of their physiological significance.

Key Words : interstitial cells of Cajal, gastric antrum, macrophage, myenteric plexus, mouse

【緒言】

消化管には、外来の刺激がなくてもペースメーカー細胞による自発性の運動が見られる。その歴史を遡っていくと、約100年前、スペインの神経組織学者Cajal⁽¹⁾が、消化管壁の神経要素周囲に突起を伸ばし網目状構造をつくる小さな紡錘形の細胞を報告したことに始まる。後に彼の名を冠してカハールの介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal ; ICC) と呼

ばれるようになった。この細胞はカハールによって、神経の興奮を平滑筋などに伝達する神経性の細胞であると考えられたものの、長い間その詳細は疑問のままであった。しかし、1982年Thuneberg⁽²⁾がICCのペースメーカー説を提唱し、ICCの研究が再び進みだした。彼の説は、マウス小腸の電子顕微鏡観察を行い、ICCが消化管運動のペースメーカーや興奮伝達の働きをするというものであった。

組織学的検索において、特異的な染色法がなかつ

^a 早稲田大学大学院人間科学研究科 (Graduate School of Human Science, Waseda University)

たため、ICCの同定には苦勞していたが、1992年 Maedaら⁽³⁾によって、ICCがc-Kitレセプターを発現することが判明した。これを契機に、c-Kitの発現が減少あるいは欠如する突然変異動物の利用により、ICCの独立した細胞型としての確立とペースメーカーとして働くことが明らかになってきた⁽⁴⁾。

これらのICCは動物種、器官や組織層により、形態学的、機能的に多様性を示すが、ICCは存在部位によって、いくつかのサブタイプ(亜型)に分類されている⁽⁵⁾。消化管全体を通して存在する輪走筋と縦走筋の間の筋層間神経叢部(myenteric plexus)に分布するICC-MP、輪走筋(circular muscle)及び縦走筋(longitudinal muscle)層内のICC-CMとICC-LM、小腸の深部筋神経叢部(deep muscular plexus)のICC-DMP、結腸の粘膜下層と輪走筋の境界部(submuscular plexus)に分布するICC-SMPなどである。これらのICCのうちICC-MPとICC-SMPは律動的な電氣的slow waveを発生させるペースメーカー機能を持ち、ICC-CMとICC-LMおよびICC-DMPは神経から平滑筋細胞への信号伝達の介在役として機能することが知られている⁽⁶⁾。

ところで、ICCの研究は、材料としての使いやすさから、伝統的に小腸を使用したものが圧倒的に多く、ICCの各論的研究の段階に入った現在、各臓器の固有性を理解する上で、ICCの詳細な解析を必要としている。特に、胃においては、胃底部、胃体部、幽門部における平滑筋運動の生理学的特性に相違が見られ⁽⁷⁾、ICCの分布にも違いがあることが報告されている^{(8)~(10)}。また、幽門前庭部に注目した研究でも、大弯側、小弯側における生理学的組織学的相違が指摘されているが⁽¹¹⁾、ICCの分布に関して未だ不明な点を数多く残している。

そこで本研究は、マウス胃を材料として、胃でも特に機能的、臨床的に重要な部位と考えられている幽門前庭部に焦点を当て、c-Kit免疫組織化学染色、及び、透過型電子顕微鏡観察を用いて、ICCの組織学的、微細構造の特徴を明らかにすることを目的として形態学的観察を行った。

【材料と方法】

生後6~8週齢の雌マウス6匹(ICR、体重23~32g)を用い、ジエチルエーテル麻酔下にて、胃各部位(図1)をそれぞれ切り出し、以下の処置を施した。なお、本研究は、早稲田大学実験実施規程に基づいて行われた(承認番号08J016)。

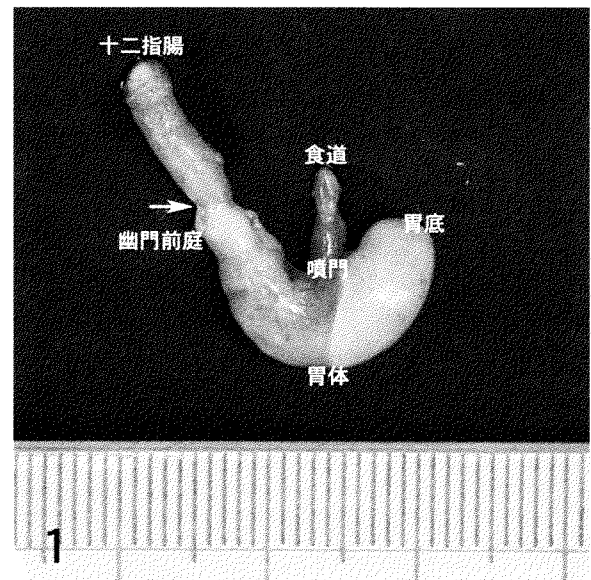


図1. 胃の領域を示すマウス胃の全体像
マウス胃の前半(近位部)と後半(遠位部)は粘膜上皮が異なるため、表面観でも異なった色調に見える。矢印は幽門括約筋によるくびれを示す。
スケールの一目盛りは1mm

1. c-Kit免疫組織化学染色

胃を3匹のマウスから摘出し、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)にて洗浄後、食道(噴門部)と十二指腸(幽門部)を糸で結紮し、形を保持した状態で、冷アセトン(4℃)で30分間固定した。胃底部、胃体部、幽門部の粘膜剥離を行った後、抗体の浸透性を高めるために0.5% Triton-X 100に10分間浸漬させた。その後、非特異的反応を防ぐために、4%Block Ace solution(大日本製薬)に室温にて20分間浸漬し、2%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)と0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで希釈した1次抗体にて、4℃・一晩反応を行った。1次抗体は、ICCには抗マウスc-Kitラットモノクローナル抗体(eBioscience社、1:100)、神経要素には抗ヒトProtein gene product 9.5(PGP9.5)ウサギポリク

ローナル抗体 (ウルトラクローン社、1:500) を用いた。一次抗体の反応後、切片をPBSで洗浄後、蛍光標識した二次抗体で室温1時間、暗所にて反応を行った。なお、ICC描出のための二次抗体には、FITC-conjugated ヤギ抗ラットIgG抗体 (Molecular Probes社、1:100)、神経要素の描出には、TRITC-conjugated ブタ抗ウサギIgG抗体 (DACO社、1:20) の混合液を2% BSAを含むPBSで希釈して用いた。反応後、PBSで洗浄し、蒸留水に通した後、退色防止剤の入ったベクターシールドにて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP2; Leica製) により観察を行った。

2. 透過型電子顕微鏡観察

3匹のマウスから全胃を摘出し、内容物をPBSで洗い流した後、筋の弛緩時の状態を保持するために、胃周囲をピンで伸展させた。4%パラフォルムアルデヒドと3%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液 (Phosphate Buffer: PB, pH7.4) に10分浸漬した後、幽門前庭部を切り出して細切した。細切した試料を同固定液にて2時間前固定し、1%四酸化オスmiumにより2時間後固定した後、3%酢酸ウラン水溶液に一昼夜浸漬してブロック染色を行った。その後、試料を上昇エタノール系列 (70%, 80%, 90%, 無水; 各10分) で脱水後、酸化プロピレンによる浸透を行い、エポキシ樹脂に包埋し約48時間、約60℃で重合させた。薄切においてはまず、準超薄切片を作製し、トルイジンブルーによる染色により、適切な箇所を選んだ後、Reichert製ミクロトームで超薄切片を作製、酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色した。真空蒸着装置 (JEE-4X; 日本電子製) にてカーボン蒸着を行った後、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX; 日本電子製) で観察した。

【結果】

マウス胃幽門前庭部の横断像をトルイジンブルー染色で観察すると (図2)、粘膜層の大半を占める幽門腺、粘膜筋板、その下層に明るく見える粘膜下層が明瞭に識別された。粘膜下層には血管や粘膜下神経叢が認められ、筋層には輪走筋と縦走筋の間に筋層間 (アウエルバッハ) 神経叢が認められた。筋層間神経叢とこの周囲に分布するICCの様子を観察す

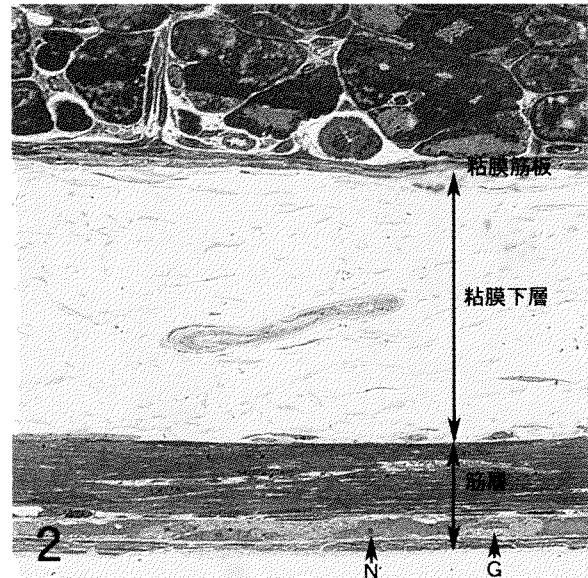


図2. マウス胃幽門前庭部の横断像、トルイジンブルー染色
粘膜層下部を占める幽門腺、粘膜筋板と明るく見える粘膜下結合組織層によって境界される筋層が明瞭に識別される。筋層には輪走筋と縦走筋の間に筋層間神経節が認められる。神経節内には、濃染した神経節細胞 (N) と薄く染まったグリア細胞 (G) が識別される。×50

るため、全載伸展標本による免疫組織化学染色をマウス胃の胃底部、胃体部、幽門前庭部の各部位で行い、神経要素とICCの分布について調べた。

神経要素は、PGP9.5-TRITCで標識された赤色の蛍光として観察され、すべての標本で胃底部から幽門前庭部に向かって、神経節は大きく神経線維束は太くなるのが認められた。胃底部 (図3) では、小さな神経節相互を結ぶ一次神経叢の網目は疎で、幽門前庭部 (図4) では神経節が太く大きく、結合する線維束は短いため、網目は密に観察された。胃体部では、胃底部と幽門前庭部の特徴を示していた。

c-Kit陽性のICCはFITCで緑色に標識され、輪走筋と縦走筋に沿って存在するICC-CMとICC-LM、筋層間神経叢部のICC-MPがすべての標本で観察された。ICC-CMとICC-LMは双極性の細胞であり、平滑筋層内の神経線維と平行に存在していることから、ICC-MPと区別することができた。ICC-MPは、多極性の細胞であり、筋層間神経叢部の周囲に存在していた。各部位でのICC-MPは、胃底部 (図3) では全く観察されず、胃体部から観察され始め、幽門

前庭部(図4)では非常に豊富に認められた。幽門前庭部のICC-MPは、神経節の周囲に加えて、神経節の側面に束状、集塊状として密集する特徴を示した。

幽門前庭部の筋層間神経叢部を透過型電子顕微鏡

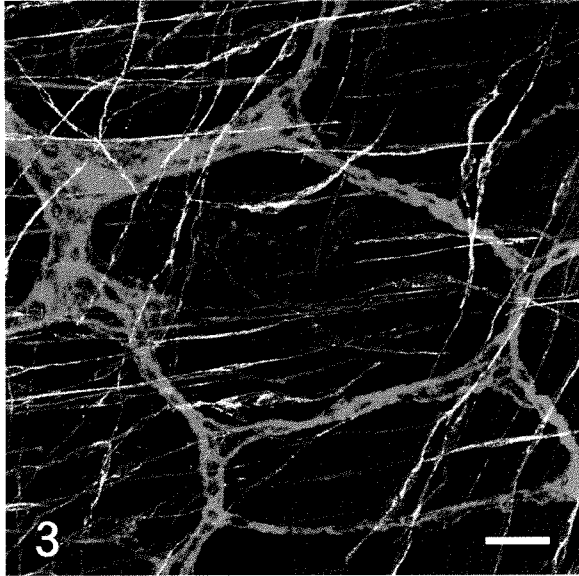


図3. 胃底部全載伸展標本の免疫組織化学染色
ICCはc-Kit-FITCで標識され緑に、神経要素はPGP9.5-TRITCに標識され赤で示される。神経節は小さく一次神経叢の網目は疎らで、輪走筋(水平方向)と縦走筋(垂直方向)の長軸に沿って存在する双極性のICC-CMとICC-LMは認められるが、筋層間神経叢部のICC-MPは観察されない。Bar=40 μ m

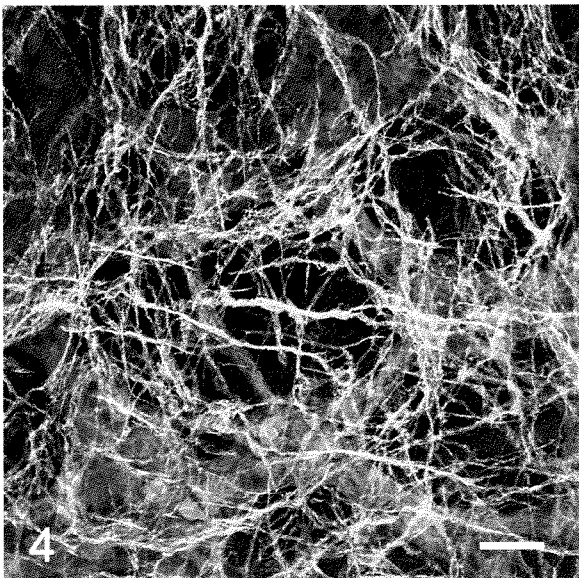


図4. 幽門前庭部全載伸展標本の免疫組織化学染色
幽門前庭部では、神経節が太く大きく、結合する線維束は短いため、網目は密に観察される。多極性のICC-MPが、神経節の側面に豊富に束状、集塊状に密集している。Bar=40 μ m

によって観察すると、筋層間神経節の周囲には、ほとんどの試料でICCの突起や線維芽細胞が取り囲むように観察された。それらのICCは、超薄切片ではしばしば紡錘形の細胞として観察されるが、ICCの微細構造上の特徴である豊富なミトコンドリア(図5)と中間径フィラメント(図6の矢頭)、細胞膜にあるカベオラ(図5の矢印)や他の細胞間とのgap junction(図7)が認められることから、線維芽細胞やその他の間葉系の細胞から識別され、ICCと同定された。このような微細構造上の特徴をもったICC-MPは、筋層間神経節の側面(図8)あるいは両筋層間の間質に他の消化管では見ることができないほど豊富に観察された。60nmほどの薄い切片上の一視野においても、ICC-MPの細胞体が3~5個観察されたことは、非常に多数のICCの存在を反映するものと推定された。このような部位ではその他にもICCの突起が多数観察され、ICC-MPの突起は隣接する筋層内に侵入することなく、むしろ、ICCの列に並行して伸びており、ICC-MP突起間にはgap junctionが観察された(図8の挿入図)。

ところで、筋層間神経叢部のICCが豊富に存在する部位では、しばしば、多数のマクロファージが密接して観察され、同時に神経終末も観察された(図9)。そして、ICCの突起の両側にマクロファージの細胞体や偽足が密接している像も観察された(図10)。

マクロファージは、比較的電子密度の低い細胞質に、細く短い偽足様突起を有し、細胞質には、light vesicle、coated vesicle、ライソゾームなどの小胞あるいは空胞が認められることから⁽¹²⁾、周囲の平滑筋や神経要素、ICCなどから識別された。細胞質内に数多く観察されたlight vesicleとcoated vesicleは、それぞれ直径0.44~0.56 μ m、0.11~0.44 μ mであり、light vesicleのほうが比較的大きかった。Light vesicleの形と大きさは様々であり、小胞の膜上にとげのあるcoated vesicleは球状で細胞の辺縁部に存在していた。ライソゾームは電子密度が高く、直径0.33~0.56 μ mであった。

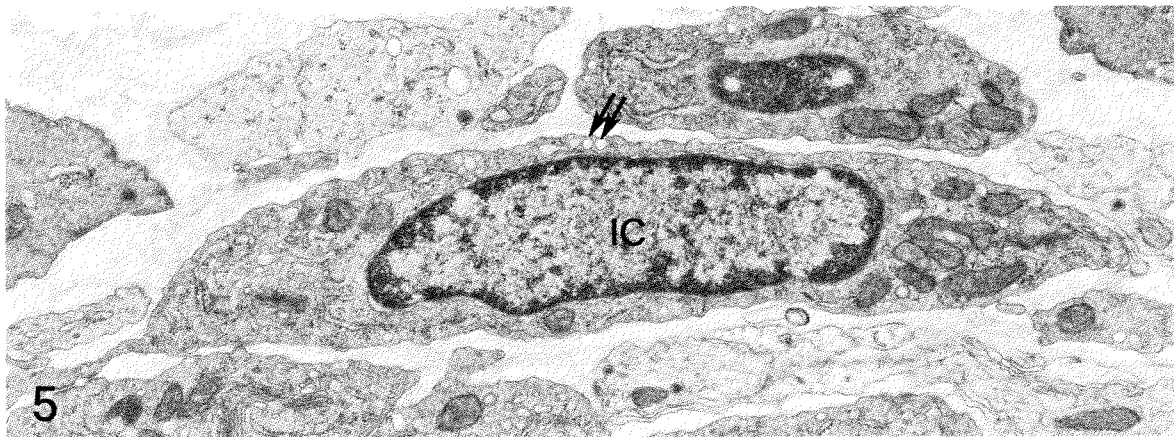


図5. 筋層間神経叢部ICC-MPの全体像を示す電子顕微鏡像

ICC (IC) は、線維芽細胞と似た特徴を示す紡錘形の細胞としてしばしば観察されるが、豊富なミトコンドリアや細胞膜に見られるカベオラ (矢印) の存在によって識別される。×16,000

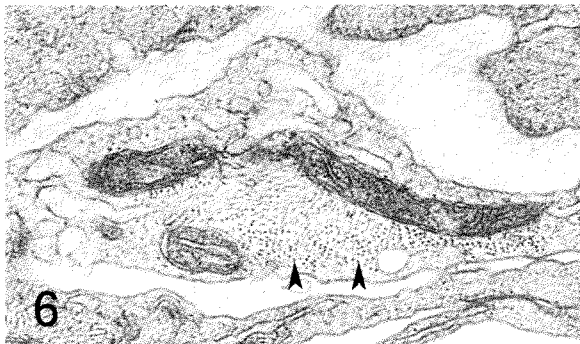


図6. ICCの細胞突起部の微細構造

細胞突起部には中間径フィラメント (矢頭) が豊富に観察される。×41,000



図7. ICC-MP細胞突起間に見られるgap junction
×150,000

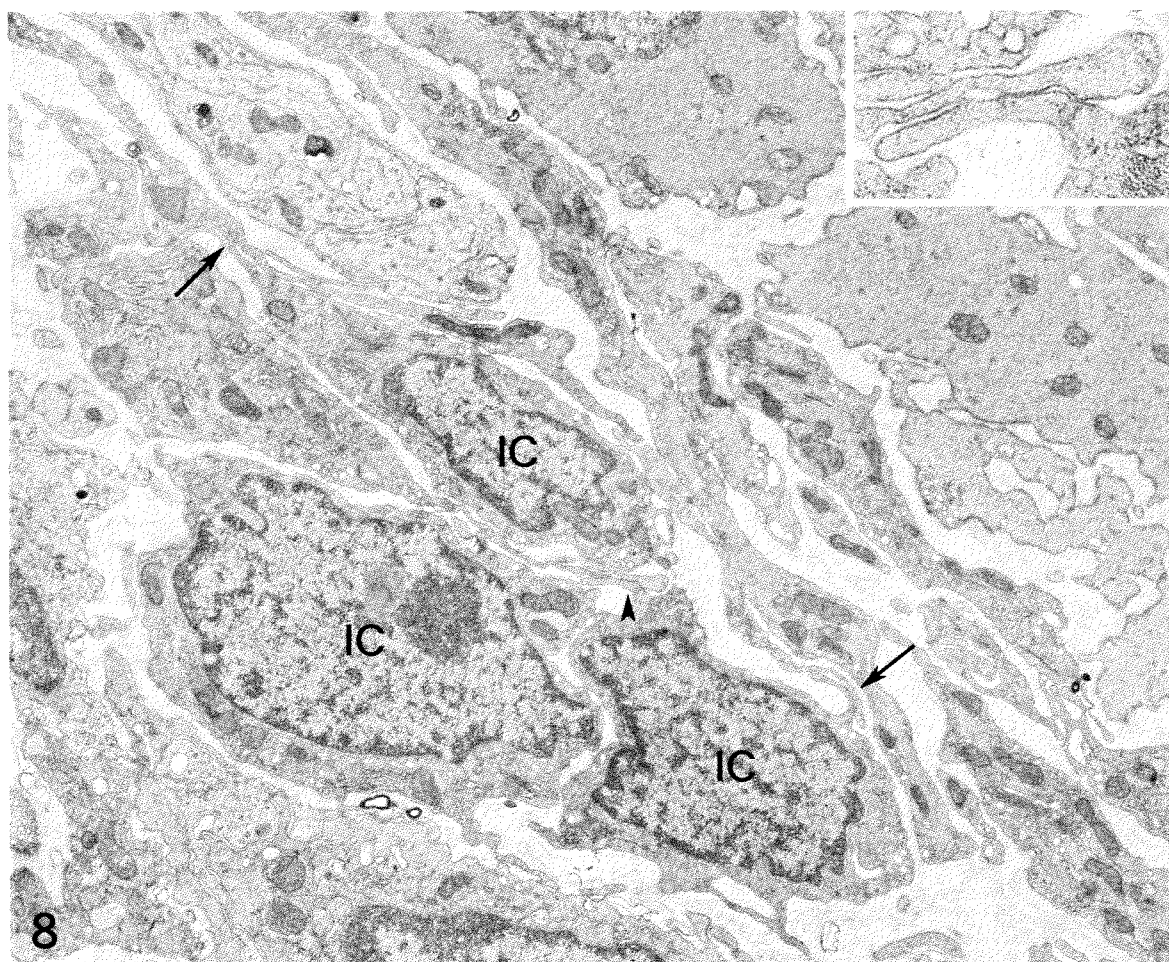


図8. マウス胃幽門前庭部の筋層間神経節の側面に存在するICC-MP
ICC-MP (IC) は、神経節の近傍に、集塊状に認められ、接着装置によって相互に連絡している (矢印)。
×12,000
図8の挿入図: 図8のICC-MP突起間 (矢頭) のギャップジャンクションの拡大図 ×21,000

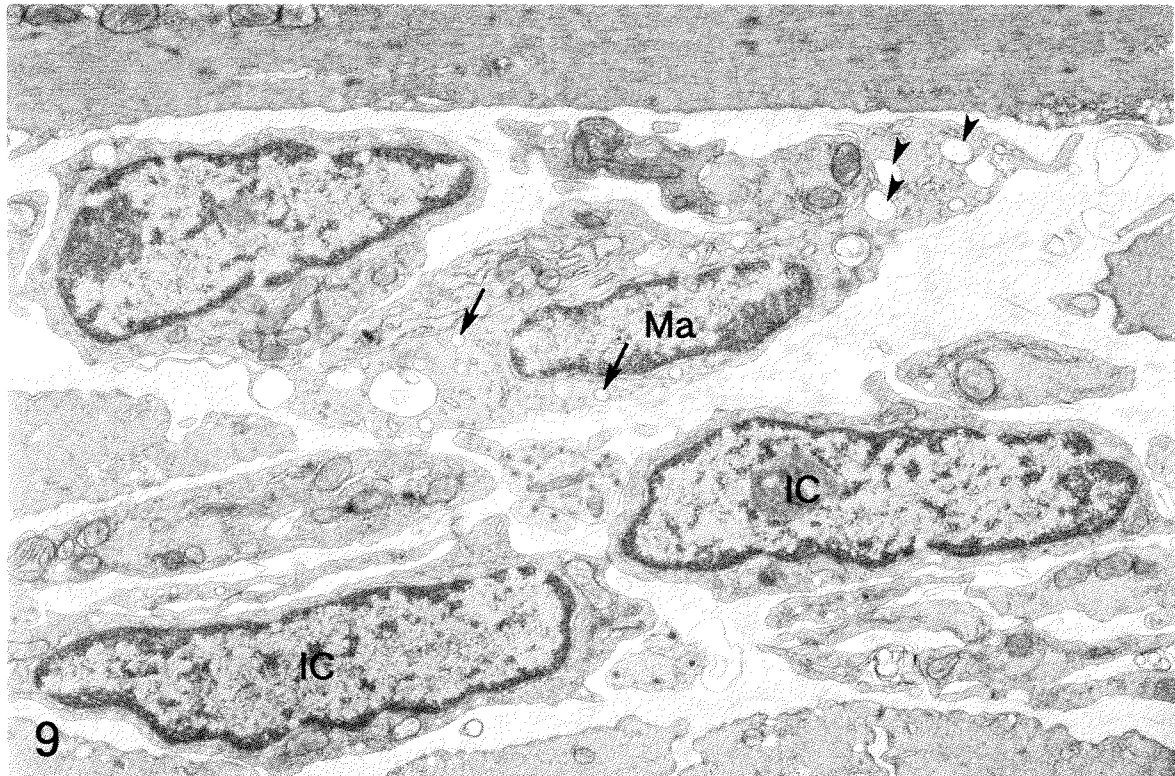


図9. 筋層間神経叢部のマクロファージとICC

豊富に存在するICC (IC) の近傍に、マクロファージ (Ma) が観察され、神経終末も近接して観察される。マクロファージの細胞質には、微細構造上の特徴であるlight vesicle (矢頭)、小胞の膜上にとげがあるcoated vesicle (矢印) などの小胞が認められる。×11,000

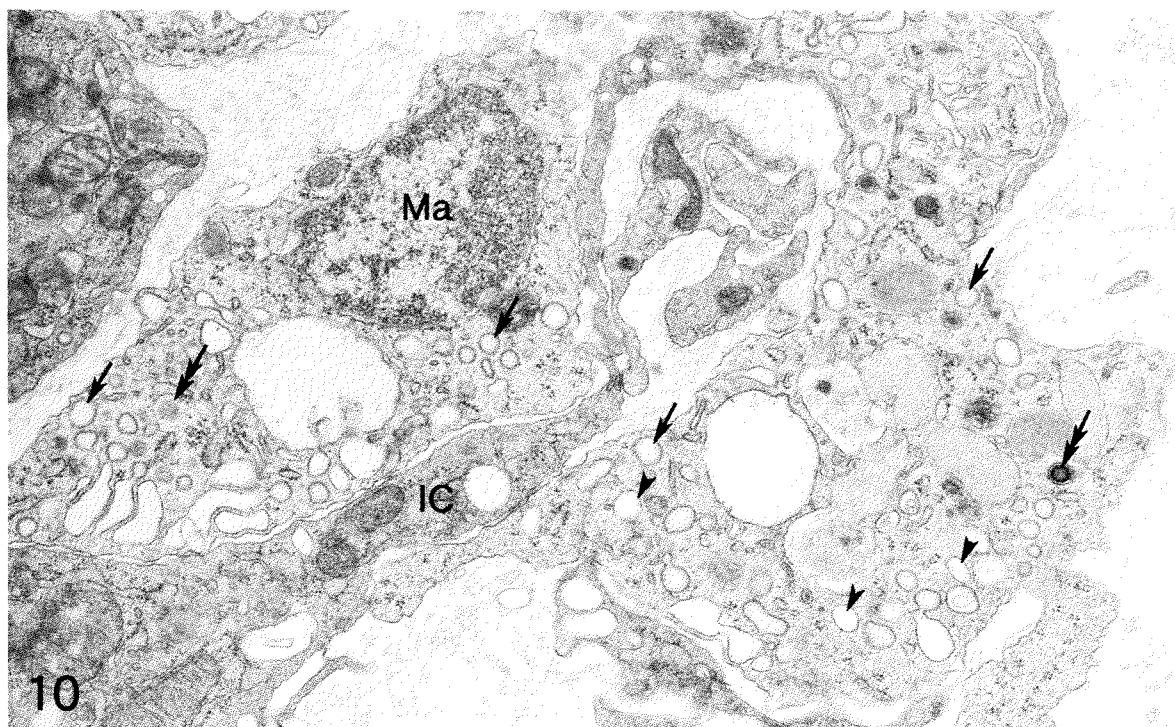


図10. ICCの突起とマクロファージ

ICC (IC) の突起の両側にマクロファージ (Ma) の細胞体や偽足が密接している。マクロファージの細胞質には、light vesicle (矢頭)、coated vesicle (矢印)、電子密度の高いライソゾーム (二頭矢印) などが多数観察される。×17,000

【考察】

本研究では、c-Kit免疫組織化学染色により、ICC-MPが胃底部では認められず、胃体部から出現し始め、幽門前庭部で豊富に存在することを明らかにした。この結果は、従来のもルモットやマウスでの観察^{(8)~(10)}と一致するもので、ICC-MPの機能に関しては、小腸と同様に⁽⁴⁾⁽¹³⁾、胃でもslow waveを発生させるペースメーカー機能を持つことが示されており⁽¹¹⁾⁽¹⁴⁾、胃体中央部から幽門前庭部に向かって、slow waveが観察され始め、蠕動運動が生じるとする生理学的報告と符合する。

ところで、c-Kit免疫染色及び透過型電子顕微鏡観察により、マウス胃幽門前庭部の筋層間神経叢部に非常に豊富なICCが存在することが明らかになったが、この事実は、特記に値する。多くのICC-MPが相互にgap junctionによって結合していることは、ペースメーカー細胞が集団として機能して、非常に大きな役割を担っている可能性を示唆するものである。

幽門前庭部におけるICC-MPの分布は、胃の円周方向によっても分布が異なり、大弯側に豊富に存在し、小弯側になるに従い少なくなる。それに伴い、検出されるslow waveの生理学的特性の異なる事が報告されているが⁽¹¹⁾、胃全体としての運動の統合性がどのように制御されているのか、詳細なICCの分布を含めた一層の検索が必要と思われる。

透過型電子顕微鏡観察において、マウス胃幽門前庭部の筋層間神経叢部では、マクロファージが高頻度に認められ、ICCや神経要素と密接していることが明らかとなった。これまで、マクロファージの存在は、マウスやもルモットの小腸で確認されており、筋層間神経叢部に存在するマクロファージは規則的に存在し、ICCと密接することが報告されているが⁽²⁾⁽¹²⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾、胃幽門前庭部の筋層間神経叢部における観察は新しい所見である。筋層部に存在するマクロファージは微細構造上、細胞質にcoated vesicles, pits, 一次ライソゾームを含むことが報告されているが⁽¹²⁾⁽¹⁷⁾、二次ライソゾームが少ないことから、この部位のマクロファージが貪食作用を主な機能とすることは推定しがたい⁽¹⁷⁾。

マクロファージには複数の亜型があり、各マクロファージが異なる機能を持つのではないかと考えら

れるようになっている^{(15)~(18)}。実際、実験的炎症を生じさせると、筋層部と粘膜の部位での免疫細胞の動態や発現しているサイトカインやケモカインには明らかな差があり⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾、筋層部では粘膜部位とは異なる独自の炎症応答が報告されている。実験的炎症により、筋層内に存在する常在型マクロファージの数は増加し、正常時には観察されなかった白血球や好酸球が筋層内に入り込み、筋細胞と密接する⁽²¹⁾。さらに、IL-1 β やIL-6、CD14などのサイトカインが増加し、ICCのネットワークを著しく障害させ、律動的な自発的収縮活動を障害するという⁽²⁰⁾⁽²²⁾⁽²³⁾。また、Lipopolysaccharide (LPS: リポ多糖) の投与により、マクロファージ内のcyclooxygenase-2 (COX-2) やiNOSが誘導され、平滑筋の収縮を抑制することが知られている^{(24)~(26)}。

マウス胃幽門前庭部に豊富に観察されたマクロファージに関する実験的報告はこれまで皆無であるが、その特徴的な分布と他の細胞要素との密接像は、小腸等で報告されているように、生理活性物質を放出することによって、近接している神経終末やペースメーカー細胞 (ICC-MP) あるいは平滑筋に作用し、消化管運動機能に影響を与える可能性を示唆するものと推察された。

【参考文献】

- 1) Cajal SR. Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. Compt Rend Soc Biol Paris 45:217-223 (1893).
- 2) Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? Adv Anat Embryol Cell Biol 71:1-130 (1982).
- 3) Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. Development 116:369-375 (1992).
- 4) Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Sanders KM. Mutation of the proto-oncogene *c-kit* blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. J Physiol 480:91-97 (1994).
- 5) Hanani M, Farrugia G, Komuro.

- Intercellular Coupling of Interstitial Cells of Cajal in the Digestive Tract. *Int Rev Cytol* 242:249-282 (2005).
- 6) Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111:492-515 (1996).
- 7) Suzuki H, Kito Y, Hashitani H, Nakamura E. Factors modifying the frequency of spontaneous activity. *J Physiol* 576 (3) :667-674 (2005).
- 8) Burns AJ, Herbert TM, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal in the guinea-pig gastrointestinal tract as revealed by c-Kit immunohistochemistry. *Cell Tissue Res* 290:11-20 (1997).
- 9) Seki K, Komuro T. Distribution of interstitial cells of Cajal and gap junction protein, Cx43 in the stomach of wild-type and W/W^v mutant mice. *Anat Embryol* 206:57-65 (2002).
- 10) 国沢裕美 モルモット胃幽門部におけるカハールの介在細胞 (ICC) の組織学的研究 人間科学研 究 Waseda Journal of Human Sciences 18 (2) :181-190 (2005).
- 11) Hirst GDS, Beckett EAH, Sanders KM, Ward SM. Regional variation in contribution of myenteric and intramuscular interstitial cells of Cajal to generation of slow waves in mouse gastric antrum. *J Physiol (Lond)* 540 (3) :1003-1012 (2002).
- 12) Mikkelsen HB, Thuneberg L, Rumessen JJ, Thorball N. Macrophage-Like Cells in the Muscularis Externa of Mouse Small Intestine. *The anatomical record* 213:77-86 (1985).
- 13) Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 373:347-349 (1995).
- 14) Dickens EJ, Edwards FR, Hirst GDS. Selective knockout of intramuscular interstitial cells reveals their role in the generation in slow waves in mouse stomach. *J Physiol* 531.3:827-833 (2001).
- 15) Mikkelsen HB, Mirsky R, Jessen KR, Thuneberg L. Macrophage-like cells in muscularis externa of mouse small intestine: Immunohistochemical localization of F4/80, M1/70, and Ia-antigen. *Cell Tissue Res* 252:301-306 (1988).
- 16) Mikkelsen HB, Thuneberg, Wittrup. Selective double staining of interstitial cells of Cajal and macrophage-like cells in small intestine by an improved supravital methylene blue technique combined with FITC-dextran uptake. *Ant Embryol* 178:191-195 (1988).
- 17) Mikkelsen HB, Rumessen JJ. Characterization of macrophage-like cells in the external layers of human small and large intestine. *Cell Tissue Res* 270:273-279 (1992).
- 18) Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 63:683-691 (1998).
- 19) Kinoshita K, Hori M, Fujisawa M, Sato K, Ohama T, Momotani E, Ozaka H. Role of TNF- α in muscularis inflammation and motility disorder in a TNBS-induced colitis model: clues from TNF- α -deficient mice. *Neurogastroenterol Motil* 18:578-588 (2006).
- 20) Suzuki T, Won KW, Horiguchi K, Kinoshita K, Hori M, Torihashi S, Momotani E, Itoh K, Hirayama K, Ward SM, Sanders KM, Ozaki H. Muscularis inflammation and the loss of interstitial cells of Cajal in the endothelin ETB receptor null rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G638-G646 (2004).
- 21) Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KK, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates the muscularis macrophage network and suppresses circular smooth muscle activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*

- 273:G727-G734 (1997).
- 22) Won KJ, Suzuki T, Hori M, Ozaki H. Motility disorder in experimentally obstructed intestine: relationship between muscularis inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol Motil* 18:53-61 (2006).
- 23) 堀口和秀、尾崎博 総説:腸管神経叢と常在型マクロファージ 細胞 35 (10) :388-391 (2003).
- 24) Torihashi S, Ozaki H, Hori M, Kita M, Ohota S, Karaki H. Resident macrophages activated by lipopolysaccharide suppress muscle tension and initiate inflammatory response in the gastrointestinal muscle layer. *Histochem Cell Biol* 113:73-80 (2000).
- 25) Torihashi S, Hori M, Ozaki H. Macrophages in Muscle Layer of Gastrointestinal Tract: Impairment of Muscle Contraction by Treatment with Lipopolysaccharide. *Acta Histochem. Cytochem* 34 (4) :219-222 (2001).
- 26) Hori M, Kita M, Torihashi M, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, Ozaki H, Karaki H. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G930-G938 (2001).